

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЙ У ДЕТЕЙ В СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Дерябина С.С.^{1, 2, 3}, Тузанкина И.А.^{2, 3, 4}, Власова Е.В.⁴, Лаврина С.Г.⁵,
Шершневу В.Н.^{3, 6}

¹ ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка», г. Екатеринбург, Россия

² ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург, Россия

³ ГОАУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»,
г. Екатеринбург, Россия

⁴ ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Россия

⁵ ФГБУ «Федеральный научный клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии
им. Дмитрия Рогачева», Москва, Россия

⁶ ФГБУН «Институт промышленной экологии» Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. С целью обоснования необходимости внедрения массового обследования новорожденных на первичные иммунодефицитные состояния (ПИД) методом определения количества копий кольцевых участков ДНК Т-клеточного (TREC) и В-клеточного (KREC) рецепторов лимфоцитов проведено ретроспективное исследование архивных образцов крови детей (n = 43), умерших на первом году жизни. Выраженное снижение количества TREC и (или) KREC выявлено в 16 случаях (37,0%). Клиническая картина и обнаружение микроделеции 22q11.2 у одного ребенка подтвердили диагноз ПИД. Еще в 5 образцах обнаружены изменения нуклеотидной последовательности ДНК в гене *RAG1*: два варианта миссенс-замены Lys820Arg и His249Arg (для трех образцов в гетерозиготном состоянии и для одного — в компаундном) и один уникальный, ранее не описанный вариант — с. 1315C>G (Leu439Val) в гетерозиготном состоянии. Совокупность клинических, гематологических и молекулярно-генетических данных позволяет ретроспективно верифицировать первичную иммунную недостаточность в рассматриваемых случаях. В результате проведенного исследования подтверждена необходимость внедрения метода определения TREC/KREC в программы неонатального скрининга на ПИД для их своевременной диагностики и лечения.

Ключевые слова: тяжелая комбинированная иммунная недостаточность (ТКИН), первичные иммунодефициты (ПИД), TREC, KREC, массовое обследование новорожденных, ретроспективная диагностика

RETROSPECTIVE DIAGNOSIS OF PRIMARY IMMUNODEFICIENCIES FOR CHILDREN IN SVERDLOVSK REGION

Deryabina S.S.^{a, b, c}, Tuzankina I.A.^{b, c, d}, Vlasova E.V.^d, Lavrina S.G.^e,
Shershnev V.N.^{c, f}

^a Medical Centre “Healthcare of Mother and Child”, Yekaterinburg, Russian Federation

^b Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

^c B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

^d Sverdlovsk Regional Children Clinical Hospital No. 1, Yekaterinburg, Russian Federation

^e D. Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

^f Institute of Industrial Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. In order to justify a need for mass screening of primary immunodeficiencies (PID) in a regional program for the newborns, we performed a retrospective study of blood spots (archived screening cards) from

Адрес для переписки:

Дерябина Светлана Степановна
ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана
здоровья матери и ребенка»
620041, Россия, г. Екатеринбург, ул. Флотская, 52.
Тел./факс: 8 (343) 374-31-10.
E-mail: ssderyabina@gmail.com

Address for correspondence:

Deryabina Svetlana S.
Medical Centre “Healthcare of Mother and Child”
620041, Russian Federation, Yekaterinburg,
Flotskaya str., 52.
Phone/Fax: 7 (343) 374-31-10.
E-mail: ssderyabina@gmail.com

Образец цитирования:

С.С. Дерябина, И.А. Тузанкина, Е.В. Власова, С.Г. Лаврина,
В.Н. Шершневу «Ретроспективная диагностика первичных
иммунодефицитных состояний у детей в Свердловской
области» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 6.
С. 583–588. doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-583-588

For citation:

S.S. Deryabina, I.A. Tuzankina, E.V. Vlasova,
S.G. Lavrina, V.N. Shershnev “Retrospective diagnosis
of primary immunodeficiencies for children in Sverdlovsk
Region”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 6, pp. 583–588.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-583-588

© Дерябина С.С. и соавт., 2016

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-6-583-588

the babies who deceased at the first year of life ($n = 43$). To this purpose, the copy numbers of T-cell receptor excision circles (TREC) and kappa-deleting recombination excision circles (KREC) have been measured. Notably decreased levels of TREC and (or) KREC were revealed in 16 cases (37.0%). Typical clinical pattern and presence of 22q11.2 deletion confirmed a PID diagnosis (DiGeorge syndrome) in one case. In five additional cases, the *RAG1* gene defects have been detected, i.e., His249Arg (two heterozygous patients in our study), and Lys820Arg variants (one heterozygous case, and one compound heterozygote) have been observed in our group. Moreover, one novel mutation was revealed in heterozygous state, i.e., c.1315C>G (Leu439Val). A synopsis of clinical patterns, hematological data, immunological testing and molecular biology could establish the PID diagnosis in these cases. Hence, we have confirmed a need for introduction of TREC and KREC determination in neonatal PID screening programs, aiming for their timely diagnostics and treatment.

Keywords: severe combined immunodeficiency (SCID), primary immunodeficiency (PID), TREC, KREC, newborn screening, retrospective diagnosis

Работа выполнена при финансовой поддержке постановления № 211 Правительства Российской Федерации, контракт № 02.A03.21.0006.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Введение

Начиная с XX века обществу стали доступны эффективные способы лечения некоторых видов наследственной патологии, позволяющие избежать летального исхода и предотвратить развитие тяжелой инвалидности у ребенка, если заболевание выявлено до начала его клинических проявлений. Самый простой и перспективный метод ранней диагностики таких болезней — массовое обследование новорожденных, или неонатальный скрининг. Эта новейшая технология позволяет не только выявлять больных младенцев на доклинической стадии заболевания и своевременно начинать лечение, но также формировать «группы риска» детей, нуждающихся в медико-генетическом наблюдении и обследовании на носительство мутантного гена, с обязательным выходом на пренатальную диагностику в семьях с отягощенным анамнезом [2]. На сегодняшний день программы неонатального скрининга внедрены более чем в 50 государствах мира и насчитывают около 45 скринируемых наследственных заболеваний (нозологий).

За последнее десятилетие в практику здравоохранения многих стран активно внедряется определение универсального маркера Т-клеточных иммунодефицитов — TREC (T-cell receptor excision circle) [14]. TREC формируются в процессе V(D)J-реаранжировки, когда часть генетического материала вырезается и замыкается в кольцо. В ходе пролиферации клеток иммунной системы такие эксцизионные кольца остаются в одной из дочерних клеток, что позволяет использовать определение их количества как показатель функциональной активности тимуса — его способности продуцировать Т-лимфоциты и тем самым рассматривать TREC как суррогатный маркер нормального развития иммунной системы [4]. Аналогично образуются KREC (kappa-deleting recombination excision circles) — В-клеточные эксцизионные кольца,

наличие которых в В-лимфоците является показателем эффективности развития В-клеточного звена иммунной системы в процессе эмбриогенеза. Методика использования данных маркеров для неонатального скрининга стартовала в 2008 году в штате Висконсин (США) [14]. С тех пор количество стран с государственной Программой массового обследования новорожденных на тяжелую комбинированную иммунную недостаточность (ТКИН) неуклонно растет [12]. Обследование основано на количественном анализе TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, которое также весьма эффективно и для диагностики других состояний, связанных с дефицитом Т- или В-клеток [13]. Сниженные уровни TREC/KREC (или их полное отсутствие) позволяют немедленно откорректировать объем терапевтических или оперативных вмешательств (трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, ферментозаместительная и генная терапии), предупредив развитие тяжелых инфекций, аутоиммунных и других воспалительных заболеваний.

В 2013 году в России разработан отечественный набор реагентов для количественного одновременного определения копий TREC и KREC, который может применяться для оценки эффективности функционирования иммунной системы пациентов различного возраста и, что особенно ценно, у новорожденных [1]. Однако обсуждение возможности добавления в национальную Программу скринирования новорожденных теста на ТКИН предлагается пока только на уровне иммунологического и педиатрического сообществ.

Целью данного исследования явилось научное обоснование необходимости включения в региональные программы массового обследования новорожденных детей исследований TREC и KREC для диагностики тяжелых комбинированных иммунодефицитов на основе проведения ретроспективного генетического анализа образцов крови больных детей, заболевания которых закончились летальным исходом на первом году жизни.

Пациенты и методы исследования

В настоящее ретроспективное исследование включены дети ($n = 43$, 19 мальчиков и 24 девоч-

ки), умершие на первом году жизни в возрасте от 5 суток до 10 месяцев жизни за период 2012–2014 гг. на административной территории Свердловской области. В исследование включены дети с врожденными пороками развития ($n = 13$), острыми вирусными инфекциями ($n = 5$), другими инфекционными заболеваниями — пневмония, некротизирующий энтероколит, сепсис ($n = 17$) и иными заболеваниями ($n = 7$). Контрольную группу составили 52 клинически здоровых новорожденных ребенка (26 девочек и 26 мальчиков) в возрасте от 3 до 8 дней. Критерием отбора в данную группу служили отрицательные результаты неонатального скрининга по 16-ти скринируемым заболеваниям [3] и отсутствие данных об обращении родителей ребенка для получения консультации иммунолога или госпитализации ребенка в 2012–2015 гг. по поводу иммунозависимой патологии. В данной группе были определены референсные значения концентраций TREC и KREC для условно здоровых детей периода новорожденности.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили архивные образцы периферической крови на стандартных бумажных тест-бланках, взятые на 3–4 день жизни, для проведения стандартного неонатального скрининга. Экстракция ДНК из сухих пятен крови для методики количественной ПЦР в реальном времени проводилась с помощью коммерческого набора «ДНК-сорб-В» (Амплисенс, Россия). Геномную ДНК из сухих пятен крови и образцов цельной крови, используемую для молекулярно-генетических исследований с целью верификации диагноза «первичный иммунодефицит» (ПИД — ТКИН), выделяли автоматическим методом на станции MagNa Pure LC 2.0 (Roche, США).

Количественное определение маркеров наивных Т- и В-клеток было проведено с помощью мультиплексной тест-системы, созданной на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск) и Новосибирского государственного исследовательского университета (г. Новосибирск), совместно с ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 (ДГКБ № 9) им. Г.Н. Сперанского (Москва) [1].

Анализ делеции 22 хромосомы детей с подозрением на синдром Ди Джорджи проводили в лаборатории молекулярной диагностики на базе Клинико-диагностического центра «Охрана здоровья матери и ребенка» (главный врач — Е.Б. Николаева, заведующий лабораторным отделом — В.В. Ворошнин) методом мультиплексной лигазной амплификации проб (MLPA). В работу был взят коммерческий набор SALSA MLPA probemix P250-B2 DiGeorge (MRC-Holland, The

Netherlands). Анализ образцов проводили согласно инструкции фирмы-производителя (MRC-Holland) на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (США). Полученные данные обрабатывали с помощью ПО Coffalyser (MRC-Holland).

Исследование генов *IL2RG* и *RAG1* проводили совместно с коллегами из лаборатории молекулярной биологии Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева (ФНКЦ ДГОИ им. Дм. Рогачева, Москва, директор — академик А.Г. Румянцев, заведующая лабораторией — Е.С. Райкина). Было выполнено прямое автоматическое секвенирование кодирующих областей генов, включая области экзон-интронных соединений. Амплификацию необходимых фрагментов геномной ДНК осуществляли методом ПЦР на программируемом термоциклере DNA Engine™ Dyad (Bio Rad, США). Секвенирование ПЦР-фрагментов с целью выявления редких мутаций проводилось согласно протоколу фирмы-производителя на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems, США).

Для статистической обработки полученных данных использовали пакет прикладных программ Statistica 6.0 и электронных таблиц Excel 2007.

Результаты и обсуждение

В зарубежных исследованиях используются различные подходы к оценке уровня содержания TREC и KREC: количество копий в расчете на микролитр крови, копий на условное количество ядросодержащих клеток, количество копий на реакцию [5, 7]. В нашей работе мы определяли количество копий TREC/KREC в объеме периферической крови, взятой для экстракции ДНК и в пересчете на количество ядросодержащих элементов в этом объеме — копий на 10^4 лейкоцитов. В результате количественной оценки содержания TREC и KREC в лимфоцитах периферической крови 52 клинически здоровых новорожденных детей было определено абсолютное количество копий данных маркеров лимфопоеза, которые в дальнейшем были приняты за референсные значения. В качестве «отсечки», разграничивающей понятия «норма — патология», мы рассматривали минимальный уровень TREC и KREC, обнаруженный в контрольной группе.

Сопоставление количества копий Т- и В-клеточных эксцизионных колец, полученных в образцах крови 43 детей, умерших на первом году жизни, показало, что у 27 пациентов (63,0%) оба показателя были выше порогового уровня контрольной группы. Это позволило отказаться от рабочей версии о наличии у данных детей неverified первичного иммунодефицита. Однако у 16 детей — 8 мальчиков и 8 девочек — (37,0%) содержание TREC и (или) KREC оказалось значительно ниже минимального значения,

определенного для условно здоровых детей. При этом 4 ребенка имели сниженными сразу оба показателя, у 6 детей были низкие значения только TREC, еще у 6 — только KREC.

Мы провели анализ клинико-anamnestических данных детей со сниженными уровнями маркеров TREC и KREC, а в некоторых случаях, при доступности биологического материала в достаточном количестве, нами была выполнена молекулярно-генетическая диагностика первичных иммунодефицитов у этих пациентов.

На основании проведенного анализа выяснено, что дебют клинической манифестации заболеваний охватывал период от нескольких дней до 10 месяцев и более чем в 70% случаев (11/16) приходился на первые 3 месяца жизни.

Шесть детей из группы с низкими TREC и/или KREC имели множественные врожденные пороки развития, затрагивающие сердечно-сосудистую систему (5 случаев врожденных пороков сердца), внутренние органы (гастрошизис — 1 случай, пороки развития кишечника с формированием кишечной непроходимости — 1 случай, пороки развития почек и мочевыводящих путей — 2 случая), лицевой дисморфизм — один случай. Матери двоих детей имели диагноз ВИЧ-инфекции.

Спектр клинических проявлений представлен следующей инфекционной патологией: сепсис новорожденных — 5 случаев, пневмония — 3 случая, острая вирусная инфекция, осложненная — 3 случая, по 1 случаю острой респираторной инфекции и некротического энтероколита. В 2-х описываемых случаях инфекция приняла генерализованный характер, для 3-х детей состояние осложнилось разлитым гнойным перитонитом. У одного ребенка наблюдался выраженный геморрагический синдром.

Изменение состояния тимуса, по данным ультразвукового сканирования, отмечено у 12 (75,0%) детей из этой группы, в том числе гипоплазия тимуса — 8 случаев, микрокистозная гипопластическая дисплазия — 2 случая, акцидентальная трансформация (по данным постмортального исследования) — 2 случая.

Описанные клинические проявления заболевания, данные инструментально-диагностических и лабораторных исследований, а также результаты постмортальной верификации диагноза у детей, умерших на первом году жизни, позволяют предположить, что летальные исходы явились следствием тяжелой наследственной патологии иммунитета, не диагностированной прижизненно.

Кроме того, в пользу диагноза первичного иммунодефицита свидетельствуют результаты ретроспективной ДНК-диагностики для архивных образцов крови обследуемой группы детей. В настоящее время известно порядка 20-ти генов, ответственных за развитие ТКИН. Опираясь на работы зарубежных исследователей [12], мы провели молекулярную диагностику генети-

ческих дефектов в генах *IL2RG* (OMIM 300400) и *RAG1* (OMIM 175615), а также синдрома делеции 22q11.2 (OMIM 188400) — как самого частого микроделеционного синдрома, ассоциированного с иммунодефицитом.

На сегодняшний день обследованы образцы ДНК 5-ти детей с ВПС на наличие микроделеции 22-й хромосомы (del22q11.2). Молекулярно подтверждена del22q11.2 у одного пациента с клиническим диагнозом синдрома Ди Джорджи (TREC_{low}KREC_{low}).

Для исключения X-сцепленного варианта ТКИН для мальчиков со сниженными TREC/KREC был проведен молекулярно-генетический анализ гена *IL2RG*. Ни в одном образце ДНК не было выявлено нарушений нуклеотидной последовательности данного гена.

Молекулярно-генетический анализ еще одного из генов, ассоциированных с развитием ТКИН, гена активации рекомбиназы, *RAG1* — был выполнен для 8 детей со сниженными TREC/KREC. У одного ребенка (TREC_{low}) выявлена замена NM_000448.2: c.2571A>G, (Lys820Arg) в гетерозиготном состоянии, описанная в международной базе по мутациям HGMD (CM068079) как вероятно патогенная и ассоциированная с повышенным риском развития неходжкинских лимфом [6]. В 2-х образцах ДНК (KREC_{low}) в гетерозиготном состоянии обнаружена другая нуклеотидная замена NM_000448.2: c. 746 A> G (His249Arg), также описанная в международной базе по мутациям HGMD (CM122460) [8]. Один из детей (TREC_{low}KREC_{low}) являлся компаундом по этим изменениям: Lys820Arg / His249Arg. Согласно литературным данным, указанные варианты нуклеотидных замен встречаются у пациентов с ТКИН, в частности Оменн-подобным синдромом и фенотипом T-B⁺NK⁺/. Однако в последнее время большинство исследователей относят их к нейтральным полиморфизмам [9]. Исходя из этого, мы не можем с большой вероятностью утверждать, что данные замены в ДНК явились причиной летального исхода пациента. Однако тот факт, что подобный генотип был отмечен в научных статьях у пациентов с клинически подтвержденным ТКИН, а также анализ клинико-anamnestических данных описываемого пациента (гипотрофия, множественные эпизоды обструктивного бронхита в течение первых 6-ти месяцев, кардиомиопатия, язвенно-некротический ларингит, трансформация тимуса III фазы и острая двусторонняя прогрессирующая пневмония, приведшая к летальному исходу в 10 месяцев), говорит скорее в пользу нашей гипотезы о врожденном дефекте иммунной системы ребенка как первопричины нарушения ее функционирования на первом году жизни.

Еще у одного пациента из группы сниженных TREC и KREC мы обнаружили в гене *RAG1* не описанную ранее нуклеотидную замену NM_000448.2: c. 1315C>G (Leu439Val) в гетерозиготном состоянии. Теоретические расчеты

in silico (PolyPhen2.0) дают основания рассматривать данный вариант замены как вероятно патогенный. Ввиду ограниченного количества доступного биоматериала ребенка и отсутствия выхода на взаимодействие с родителями, нам не удалось обнаружить вторую мутацию. Тем не менее, совокупность клинических, гематологических и косвенно-молекулярно-генетических данных не отвергают диагноз ТКИН также и в рассматриваемом случае.

Для остальных пациентов предполагать определенные виды ТКИН, основываясь на данных о нуклеотидных заменах в одном гене, невозможно. Для дифференциальной диагностики различных вариантов первичных иммунодефицитов в нашем случае оптимальным вариантом послужили бы повторные исследования ДНК на панель первичных иммунодефицитов методом секвенирования следующего поколения (next-generation sequencing, NGS).

Заключение

Проведенное ретроспективное исследование TREC и KREC в образцах крови детей раннего возраста, умерших от различных причин, позволило предположить в ряде случаев наследственную патологию иммунной системы. В одном из них подтвержден диагноз первичного иммунодефицита — синдром del22q11.2, еще в пяти случаях обнаружены изменения в нуклеотидной последовательности гена *RAG1*, ответственного за активацию рекомбиназ во время V(D)J-реаранжировки T- и B-клеточных рецепторов, причем 2 варианта замен описаны в международной базе данных HGMD как ассоциированные с фенотипом дефектного функционирования иммунной системы, и один вариант замены яв-

ляется уникальным, ранее не описанным. Подобные находки дают основание утверждать, что причиной летального исхода данных детей могла быть тяжелая комбинированная иммунная недостаточность (ТКИН).

Таким образом, количественная оценка TREC и KREC в сухом пятне крови, взятого для неонатального скрининга может иметь диагностическую ценность в анализе некоторых случаев младенческой смертности, регистрация которых в настоящее время проводится по фенотипическим проявлениям заболеваний, снижая тем самым статистическую величину распространения патологии (ПИД). Кроме того, ретроспективно установленный диагноз ТКИН является показанием для направления пострадавшей семьи на медико-генетическое консультирование.

Внедрение современных генетических технологий, в частности программы скрининга на тяжелый комбинированный иммунодефицит, в практику массового обследования новорожденных способствует ранней диагностике врожденных ошибок иммунитета и тем самым может значительно улучшить качество и продолжительность жизни детей с наследственными заболеваниями, относящимися к категории первичных иммунодефицитов.

Благодарности

Авторы выражают искреннюю благодарность заведующей отделением иммунологии ФНКЦ ДГОИ им Дмитрия Рогачева, д.м.н., профессору Щербине Анне Юрьевне за проявленную заинтересованность к данной работе и активное содействие в проведении ретроспективной молекулярной диагностики ПИД.

Список литературы / References

1. Гордукова М.А., Оскорбин И.П., Мишукова О.В., Зимин С.Б., Зиновьева Н.В., Давыдова Н.В., Смирнова А.С., Никитина И.А., Корсунский И.А., Филиппенко М.Л., Продеус А.П. Разработка набора реагентов для количественного определения молекул ДНК TREC и KREC в цельной крови и сухих пятнах крови методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 467-478. [Gordukova M.A., Oskorbin I.P., Mishukova O.V., Zimin S.B., Zinovieva N.V., Davydova N.V., Smirnova A.S., Nikitina I.A., Korsunsky I.A., Filipenko M.L., Prodeus A.P. Development of real-time multiplex pcr for the quantitative determination of TREC'S and KREC'S in whole blood and in dried blood spots. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 5, no. 17, pp. 467-478. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-5-467-478>
2. Краснопольская К.Д. Наследственные болезни обмена веществ. Справочное пособие для врачей. М.: ООО «Центр социальной адаптации и реабилитации детей «Фохат», 2005. 364 с. [Krasnopol'skaya K.D. Hereditary diseases of a metabolism. The handbook for physicians]. Moscow: ROO Tsentr sotsial'noi adaptatsii i reabilitatsii detei "Fokhat" Publ., 2005. 364 p.
3. Приказ МЗ Свердловской области от 02.03.2012 г. № 166-п «О совершенствовании массового обследования новорожденных детей на наследственные заболевания на территории Свердловской области». URL: <http://ekb4.info/Yekaterinburg8/prikaz16.htm> (дата обращения: 28.04.2015). [The order of Health Ministry of Sverdlovsk region of 02.03.2012 no. 166-p. About perfecting of mass inspection of newborn children on heritable diseases in the territory of Sverdlovsk region. <http://ekb4.info/Yekaterinburg8/prikaz16.htm>, accessed on 28.04.2015. (In Russ.)]
4. Chan K., Puck J.M. Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005, Vol. 115, pp. 391-398.
5. Gerstel-Thompson J.L., Wilkey J.F., Baptiste J.C., Navas J.C., Pai S.-Yu., Pass K.A., Eaton R.B., Comeau A.M. High-throughput multiplexed T-cell-receptor excision circle quantitative PCR assay with internal controls for

detection of severe combined immunodeficiency in population-based newborn screening. *Clinical Chemistry*, 2010, Vol. 56, no. 9, pp. 1466-1474.

6. Hill D.A., Wang S.S., Cerhan J.R., Davis S., Cozen W., Severson R.K., Hartge P., Wacholder S., Yeager M., Chanock S.J., Rothman N. Risk of non-Hodgkin lymphoma (NHL) in relation to germline variation in DNA repair and related genes. *Blood*, 2006, Vol. 108, no. 9, pp. 3161-3167

7. Janik K.D., Lindau-Shepard B., Comeau A.M., Pass K.A. A multiplex immunoassay using the Guthrie specimen to detect T-cell deficiencies including severe combined immunodeficiency disease. *Clinical Chemistry*, 2010, Vol. 56, no. 9, pp. 1460-1465.

8. Kutukculer N., Gulez N., Karaca N.E., Aksu G., Berdeli A. Novel mutations and diverse clinical phenotypes in recombination-activating gene 1 deficiency. *Ital. J. Pediatr.*, 2012, Vol. 38, p. 8.

9. Notarangelo L.D., Fischer A., Geha R.S., Casanova J.L., Chapel H., Conley M.E., Rundles C.C., Etzioni A., Hammarstrom L., Nonoyama S., Ochs H.D., Puck J., Roifman C., Seger R., Wedgwood J. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2009, Vol. 124, pp. 1161-1178.

10. Olbrich P., de Felipe B., Delgado-Pecellin C., Robero R., Rojas P., Aguayo J. A first pilot study on the neonatal screening of primary immunodeficiencies in Spain: TRECs and KRECs identify severe T- and B-cell lymphopenia. *An Pediatr (Barc.)*, 2014, Vol. 81, no. 5, pp. 310-317

11. Serana F., Chiarini M., Zanotti C., Sottini A., Bertoli D., Bosio A., Caima L., Imberti L. Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies. *Journal of Translational Medicine*, 2013, Vol. 11, p. 119.

12. van der Spek J., Groenwold R.H.H., van der Burg M., van Montfrans J.M. TREC based newborn screening for severe combined immunodeficiency disease: a systematic review. *J. Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 35, pp. 416-430.

13. van Zelm M. C., van der Burg M., Langerak A.W., van Dongen J.J.M. PID comes full circle: applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. *Frontiers in Immunology*, 2011, Vol. 2, no. 12, pp. 1-8.

14. Verbsky J., Thakar M., Rartes J. The Wisconsin approach to newborn screening for severe combined immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 129, no. 3, pp. 622-627

Авторы:

Дерябина С.С. — заведующая лабораторией молекулярной диагностики ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка»; младший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН; младший научный сотрудник кафедры иммунохимии ХТИ ГОАУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Тузанкина И.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН; ведущий научный сотрудник кафедры иммунохимии ГОАУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина; врач аллерголог-иммунолог научного отдела ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Россия

Власова Е.В. — к.м.н., заведующая отделением клинической иммунологии ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Россия

Лаврина С.Г. — врач клинической лабораторной диагностики лаборатории молекулярной биологии ФГБУ «Федеральный научный клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева», Москва, Россия

Шершнев В.Н. — к.ф.-м.н., научный сотрудник ФГБУН «Институт промышленной экологии» Уральского отделения РАН; доцент кафедры вычислительной техники, ГОАУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Deryabina S.S., Head, Laboratory of Molecular Diagnostics, The Medical Centre "Healthcare of Mother and Child"; Junior Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Medical Sciences; Junior Research Associate, Department of Immunochemistry, B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Tuzankina I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Medical Sciences; Leading Research Associate, Department of Immunochemistry, B. Yeltsin Ural Federal University; Clinical Allergologist/Immunologist, Research Department, Sverdlovsk Regional Children Clinical Hospital No. 1, Yekaterinburg, Russian Federation

Vlasova E.V., PhD (Medicine), Head, Department of Immunology, Sverdlovsk Regional Children Clinical Hospital No. 1, Yekaterinburg, Russian Federation

Lavrina S.G., Laboratory Clinician, Laboratory of Molecular Biology, D. Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

Shershnev V.N., PhD (Physics & Mathematics), Research Associate, Institute of Industrial Ecology; Assistant Professor of Computer Engineering Department, B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 14.07.2016
Принята к печати 27.08.2016

Received 14.07.2016
Accepted 27.08.2016